



(Translation)

**PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT**

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: May 11, 2001

Application Number: Japanese Patent Application
No. 2001-142482

Applicant(s): KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

October 27, 2003

Commissioner,
Patent Office

Yasuo IMAI (seal)

Certificate No. 2003-3088655

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 5 月 1 1 日
Date of Application:

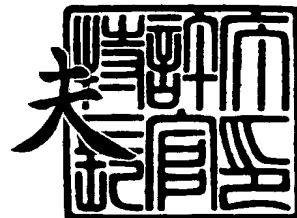
出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 1 4 2 4 8 2
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 1 - 1 4 2 4 8 2]

出 願 人 麒麟麦酒株式会社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 0 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 8 8 6 5 5

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01-0364

【提出日】 平成13年 5月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 16/00

【発明の名称】 抗 C D 4 0 モノクローナル抗体

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 吉田 均

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 高橋 信明

【特許出願人】

【識別番号】 000253503

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809317

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗CD40モノクローナル抗体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)～(f)から選ばれる少なくとも1つの性質を有する、CD40に対する抗体又はその機能的断片。

- (a) 樹状細胞に作用し、LPS及びIFN γ の存在下でIL-12を生産させる
- (b) 樹状細胞に作用し、該樹状細胞を成熟させる活性がG28-5抗体よりも高い
- (c) B細胞又はその樹立細胞株に対して、CD95の発現を促進する活性がG28-5抗体よりも高い
- (d) B細胞樹立細胞株に対して増殖を抑制する活性がG28-5抗体よりも高い
- (e) B細胞樹立細胞株に対して細胞死を誘導する
- (f) CD40リガンドのCD40に対する結合を阻害しない

【請求項2】 樹状細胞の成熟が、20 μ g/ml以下の抗体濃度で行われるものである請求項1記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項3】 B細胞樹立細胞株に対してCD95の発現の促進が、20 μ g/ml以下の抗体濃度で行われるものである請求項1記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項4】 B細胞樹立細胞株がRamos又はHS-Sultonである請求項1記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項5】 受託番号がFERM BP-7578であるハイブリドーマKM302-1により産生される、CD40に対する抗体又はその機能的断片。

【請求項6】 以下の(g)～(j)から選ばれる少なくとも1つの性質を有する、CD40に対する抗体又はその機能的断片。

- (g) CD40に対するリガンドの作用を中和する
- (h) B細胞又はその樹立細胞株上のCD40に対するリガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を中和又は緩和し、かつ、抗免疫グロブリン抗体による架橋によって前記B細胞又はその樹立細胞株上のCD40に対するアゴニスティックな作用が5D12より弱い
- (i) B細胞樹立細胞株に対して、架橋したCD40リガンドが、CD95の発現を増加させる作用を緩和又は中和する

(j) 樹状細胞に発現するCD40に対してアンタゴニスティックな作用を有する

【請求項 7】 受託番号がFERM BP-7579であるハイブリドーマKM281-1-10、又は受託番号がFERM BP-7580であるハイブリドーマKM281-2-10-1-2により産生される、CD40に対する抗体又はその機能的断片。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む、免疫賦活化剤、抗腫瘍剤又は自己免疫疾患治療剤。

【請求項 10】 請求項 6 又は 7 記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む、免疫抑制剤、自己免疫疾患治療剤、アレルギー治療剤又は血液凝固第VIII因子阻害症候群治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトのB細胞、樹状細胞（DC）等の表面に存在するヒトCD40抗原を認識する抗体又はその機能的断片に関する。具体的には、本発明は樹状細胞（DC）表面のヒトCD40抗原に対して実質的にアンタゴニスティックである抗ヒトCD40抗体又はその機能的断片、および従来の抗ヒトCD40抗体に比べてより治療効果の高いことが期待されるアゴニスティックな抗ヒトCD40抗体又はその機能的断片に関する。

【0002】

【従来の技術】

1. CD40

CD40は分子量50kDaの細胞膜表面に存在する抗原であり、B細胞、樹状細胞（DC）、ある種の癌細胞、そして胸腺上皮細胞に発現している。CD40はB細胞やDCの増殖、分化に重要な働きをしていることが知られている。CD40は、ヒトB細胞表面に発現する抗原として同定され(E. A. Clark et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986, I. Stamenkovic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989)、アミノ酸配列の相同性から、CD40は、低親和性NGFレセプターやTNFレセプター、CD

27、OX40、CD30などが属しているTNFレセプターファミリーの1つのメンバーとして考えられている。ヒトおよびマウスのCD40に対するリガンド（CD40L）は、近年遺伝子クローニングされ、II型膜蛋白質であること、及び活性化したCD4+T細胞に発現していることが分かった。CD40Lは、強力な活性化シグナルをヒトおよびマウスのB細胞に導入することも分かっている。

【 0 0 0 3 】

また、樹状細胞にはB細胞よりも多くのCD40発現が確認されており、重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。CD40がCD40Lと結合すると、抗原提示細胞（APC）の活性化、すなわちCD80（B7-1）やCD86（B7-2）などの補助刺激分子の発現、あるいはIL-12の産生が増強される（Caux, C., et al.: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J.Exp.Med., 180:1263,1994）、（Shu, U., et al.: Activated T cells induce interleukin-12 production by monocyte via CD40-CD40 ligand interaction. Eur.J.Immunol., 25:1125,1995）。樹状細胞は強い抗原提示能を有し、強力なヘルパーT（Th）細胞活性化能を持っている。また、ナイーブ（naive）Th細胞のTh1又はTh2細胞への分化を樹状細胞が制御していると考えられている。ミエロイド系樹状細胞である末梢血単球をGM-CSF及びIL-4とともに培養してCD40Lにより成熟させた樹状細胞（DC1）はin vitroにおいて、IL-12産生能を有し、異系naive Th細胞を刺激活性化し、IFN γ 産生T細胞を誘導する（すなわちTh1への分化を促す）。この作用は抗IL-12抗体により阻害されることから、IL-12を介した反応と考えられる。一方リンパ組織T領域や、末梢血に存在するplasmacytoid T細胞をIL-3、CD40リガンドとともに培養したリンパ球系樹状細胞（DC2）は、IL-12産生能は有さず、そして異系naive Th細胞を刺激活性化し、IL-4産生T細胞を誘導し、Th2への分化を促進することが示されている。Th1細胞は細胞性免疫の活性化にかかわり、Th2細胞は液性免疫能を高めると同時に細胞性免疫能の抑制に関与すると考えられている。Th1細胞のヘルプで活性化された細胞傷害性T細胞（CTL）は、細胞質内で増殖する病原体（多くのウイルス、リステリア菌、結核菌、およびトキソプラズマ原虫など）や腫瘍細胞を除去することができる。

【 0 0 0 4 】

膜表面に発現したCD40を認識する抗CD40モノクローナル抗体が、B細胞に対していろいろな生物活性を示すことは示されてきた。抗CD40モノクローナル抗体は、CD40とCD40Lとの相互作用に対してアゴニスティックなもの、アンタゴニスティックなものに大別される。

【 0 0 0 5 】

2. アゴニスティック抗体

アゴニスティック抗体の作用として、B細胞の活性化が知られている。たとえば、抗CD40抗体が細胞接着を誘導する (Barrett et al., J. Immunol. 146: 1722, 1991; Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1988)、細胞の大きさを増進する (Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1988; Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989)、抗IgM抗体、抗CD20抗体またはphorbol esterのみで活性化されたB細胞の分裂を誘導する (Clark and Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986; Gordon et al., LEUCOCYTE TYPING III. A. J. McMichael ed. Oxford University Press. Oxford, p.426; Paulie et al., J. Immunol. 142: 590, 1989)、IL4存在下でB細胞の分裂を誘導する (Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989; Gordon et al., Eur. J. Immunol. 17: 1535, 1987)、IL-4刺激、T細胞除去培養細胞のIgE (Jabara et al., J. Exp. Med. 172: 1861, 1990; Gascan et al., J Immunol. 147:8, 1991)、IgG、IgM (Gascan et al., J. Immunol. 147: 8, 1991) の発現を誘導する、IL-4によるB細胞からの可溶性CD23/FcεRIIの分泌と (Gordon and Guy, Immunol. Today 8:339, 1987; Cairns et al., Eur. J. Immunol. 18: 349, 1988) 細胞上の発現増強 (Challa A, Allergy, 54: 576, 1999) をする、IL-6の生産を促進する (Clark and Shu, J. Immunol. 145: 1400, 1990) ことが報告されている。さらには、CDw32 + 接着細胞存在下で、IL-4及び抗CD40抗体を添加することにより、ヒト初代培養B細胞から、B細胞クローンを樹立することや (Bancherau et al., Science 241: 70, 1991)、胚中心の中心細胞のアポトーシスが、抗原レセプターの働きにかかわらず、CD40を介して阻害されること (Liu et al., Nature 342: 929, 1989) が報告されている。以上のようにCD40は、ヒトB細胞表面に発現する抗原として同定されたため、単離された抗体の多くは、主にヒトB細胞に対する増殖分化誘導

機能、癌細胞における細胞死誘導活性を指標に評価されてきた(Katira, A. et. al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossossmann, et. al. eds.p.547. Oxford University Press. Oxford, W. C. Flansow et. al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossossmann, et. al. eds.p.555. Oxford University Press. Oxford, J. D. Pound et. al., International Immunology, 11: 11, 1999,)。

【 0 0 0 6 】

抗CD40抗体がDCを成熟させることが示された (Z. H. Zhou et. al., Hybridoma, 18:471 1999) 。さらに、抗原特異的CD8T細胞プライミングにおけるCD4T細胞の役割は、CD40-CD40Lシグナリングを介したDCの活性化にあることが報告され、抗CD40モノクローナル抗体(mAb)により、樹状細胞 (DC) の活性化におけるCD4ヘルパーT細胞の役割を代替できることが示された (Shoenberger, S.P., et.al.: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. Nature, 480,1998) 。また、マウスにおいて抗CD40抗体の投与によりCD40を発現する腫瘍細胞のみならず非発現腫瘍細胞からも生体を防御可能であることが示された (French,R.R., et.al.: CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. Nature Medicine, 5,1999) 。

【 0 0 0 7 】

今まで報告されてきた抗体はDC細胞に対する効果を指標に単離されているものは少ない。しかしDC細胞の機能修飾という点からは、B細胞に作用する抗体を選別したのでは、治療薬としては不十分である可能性が高い。マウスCD40に対する抗体のモノクローナル抗体では、抗体の認識するエピトープによって、DCには反応するが血管内皮細胞には反応しないクローンと、逆にDCには反応しないが血管内皮細胞には反応するクローンとが存在すると報告されている (Van Den Berg, TK, et.al., Immunology, 88:294, 1996) 。ヒトCD40抗体に関してもエピトープによってDCへの結合や作用の異なることが推測される。

【 0 0 0 8 】

抗CD40抗体又はCD40リガンドによりCD40を発現するリンパ腫細胞株の増殖を抑制し、細胞死を誘導できることが分かっている (Funakoshi S et al., Blood, 8

3: 2782, 1994)、(Funakoshi S et al., Journal of Immunotherapy, 19, 93, 1996)、(Z. H. Zhou et. al., Hybridoma, 18: 471 1999)、(Joseph A et al., Cancer Research, 60: 3225, 2000)。アゴニスティック抗体において興味深いことは、抗体の働きがCD40Lの機能と必ずしも一致しないことである。B細胞による活性化作用とB細胞腫瘍に対する増殖抑制作用も、必ずしも一致しない。DC活性化能と細胞増殖抑制作用を併せ持つ抗体の開発が望ましい。また、アゴニスティック抗体の中には、CD40LのCD40への結合を、阻害するものも、しないものも存在する(Challa A et al., Allergy, 54: 576, 1999)。例えば、G28-5(ATCC No. HB-9110)の生産する抗体はCD40Lと競合するため、CD40Lとの併用効果はない。抗体によってCD40発現細胞の活性化の程度にも差がある。単独で弱いアゴニスティック活性を示す抗体でも、CD40リガンドと併用することによって、CD40リガンド単独による活性よりも、抗体存在下で活性が著しく促進する場合がある。逆に、単独でアゴニスティック活性を示す抗体でも、CD40リガンドを阻害することによって、CD40リガンド単独による活性よりも、抗体存在下での活性を低下させてしまう場合がある(Pound et al., International Immunology, 11: 11, 1999)。CD40リガンドと競合しない抗体では、それ自身による腫瘍細胞の増殖抑制作用は弱くとも、CD40リガンド存在下ではより強い増殖抑制ができることが示されている(Joseph A et al., Cancer Research, 60: 3225, 2000)。このことから、CD40に結合し、それ自身で細胞増殖を抑制する抗体でありながら、CD40リガンドのCD40に対する結合は阻害しないような抗体を開発することが望ましい。このような特徴を生かすことにより、可溶性CD40Lよりも有効な治療薬を開発できる可能性がある。たとえば、可溶性CD40LはCD40と結合し活性化するが、同時に生体内に存在しているCD40Lの働きを抑制する。CD40Lと競合しない抗体ならば、このようなことは起こらず、相乗効果により、より良い治療効果が期待できる。

【0009】

3. アンタゴニスティック抗体

一方、上記のように、CD40が免疫反応において重要な役割を担っていることから、CD40とそのリガンドの結合を阻害することで、臓器移植時の免疫抑制や自己免疫疾患の治療薬が開発できると期待される。Sawada-Haseらは、クローン病患

者の末梢血中の単球ではCD40を強く発現する細胞の割合が上昇していることを報告している。しかしながら、CD40とそのリガンドの結合を阻害する抗体については、まだ良く分かっていない。そのような阻害性抗体は、たとえば、CD40の機能解析や、CD40の活性化が必要な疾患の治療に有効である可能性がある。また、CD40リガンドに対する阻害抗体も、CD40とCD40リガンドとの結合が関与する疾患薬として有効である可能性が示されている。しかしながら、CD40Lは活性化した血小板に発現するという報告 (V. Henn et. al., Nature 391: 591, 1998) があるため、抗CD40L抗体を治療薬として使った場合、血栓を引き起こす危険性が存在することが報告されている (T. Kawai et. al., Nat. Med. 6: 114, 2000)。このような観点から、CD40とそのリガンドの結合を阻害する抗体治療薬としては、抗CD40L抗体よりも、むしろCD40に対する抗体の方が安全性に優れると期待できる。抗CD40抗体としてはCD40Lの結合を抑制し、なおかつ、抗体自身がCD40を活性化しないことが必要とされる。

【 0 0 1 0 】

ヒトCD40に特異的に結合し、CD40Lの結合を抑制し、なおかつ、CD40を活性化しない抗体についての報告は、過去に膨大な量の研究がなされてきたにもかかわらず、5D12と命名されたマウス抗ヒトCD40抗体のわずか1例のみである (J. Kwekkeboom et. Al., Immunology 79: 439, 1993)。まして、B細胞に対して中和活性を示す抗体が、DC細胞に対しても同様に、CD40リガンドの作用を中和できるかどうかは知られていなかった。さらに、ビオチン化した抗マウスCD40抗体の作用が、アビジンでの架橋によって増強されることが報告されている (Johnson et al., Eur J Immunol, 24, : 1835, 1994)。本発明者は可溶性リガンドに予め遺伝子工学的に付与された、タグ (FLAG) に対する抗体 (M2) を用いて、可溶性CD40リガンドのB細胞株 (Ramos細胞) に対する作用を増強し、その中和活性を測定したところ、5D12 (ATCC No. HB-11339) がわずかにしか中和活性を示さないことを確認した。

【 0 0 1 1 】

本発明者は新たに、アンタゴニスト抗体である5D12が架橋によって、CD40Lの非存在下であっても、抗体単独でアゴニスト活性を持つことを見出した。従来、

マウスCD40抗体の作用がビオチンとアビジン架橋によって増強されることが報告されている (Johnson et al., Eur J Immunol, 24, : 1835, 1994)。また、プレートに固相化した抗免疫グロブリン抗体を用いて、CD40抗体を固相化することで、腫瘍細胞の増殖抑制活性が増加することが知られていたが、これは固相化による効果と考えられていた。しかし、培養液中に抗免疫グロブリン抗体を添加し、抗CD40抗体を架橋することによって、アンタゴニスティック抗体であってもアゴニスティック活性を示す可能性があることは知られていなかった。治療に用いる抗体に抗原性があれば、ヒトの体内でCD40抗体に結合する抗体が生じ、CD40抗体が架橋されることによって、あたかもCD40リガンドのような活性を生じる、全く逆の作用が懸念される。したがって治療薬の安全性の点から、抗体の抗原性を低く押さえることが非常に重要であると考えられる。マウス抗体の可変領域の配列をもとに、ヒト化技術により、治療薬として開発する場合、ヒト化抗体は免疫原性があることが知られているため、投与後に抗ヒト化抗CD40抗体ができる可能性があり、アゴニスティック抗体となる危険がある。また抗原性が低くとも、抗体レセプター (FcR) によって抗CD40抗体が架橋される可能性もある。これらの点から、アンタゴニスティック抗体は、CD40に特異的に結合し、CD40Lの結合を抑制し、かつ、架橋によってもCD40を活性化しないヒト抗体であって、FcRへの結合が弱いことが望ましいと考えられる。

【0 0 1 2】

【発明が解決しようとする課題】

上述のように、近年DC細胞の機能解析が進み、CD40はDC細胞の働きを制御する、重要な遺伝子として認識され始めた。このような背景から、本発明は、DC細胞を用いた評価系を採用することにより、樹状細胞 (DC) 表面のヒトCD40抗原に対しても実質的にアンタゴニスティックである抗ヒトCD40抗体又はその機能的断片、および従来の抗ヒトCD40抗体に比べてより治療効果の高いことが期待されるアゴニスティックな抗ヒトCD40抗体又はその機能的断片を提供することを目的とする。

【0 0 1 3】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヒトCD40に対する抗体の作製に関して鋭意研究した結果、細胞表面抗原であるCD40に結合する抗体でありながら、CD40リガンドのCD40への結合は阻害しないアゴニスティック抗体、及びCD40に結合することによりCD40リガンドのCD40への結合を阻害するアンタゴニスティック抗体を作製することに成功し、本発明を完成した。すなわち、本発明は以下の通りである。

【0014】

(1) 以下の(a)～(f)から選ばれる少なくとも1つの性質を有する、CD40に対する抗体又はその機能的断片。

- (a) 樹状細胞に作用し、LPS 及びIFN γ の存在下でIL-12を生産させる
- (b) 樹状細胞に作用し、該樹状細胞を成熟させる活性がG28-5抗体よりも高い
- (c) B細胞又はその樹立細胞株に対して、CD95の発現を促進する活性がG28-5抗体よりも高い

(d) B細胞樹立細胞株に対して増殖を抑制する活性がG28-5抗体よりも高い

(e) B細胞樹立細胞株に対して細胞死を誘導する

(f) CD40リガンドのCD40に対する結合を阻害しない

上記樹状細胞の成熟は、例えば20 μ g/ml以下の抗体濃度により行われる。また、CD95の発現の促進は、20 μ g/ml以下の抗体濃度で行われる。

B細胞樹立細胞株としては、Ramos又はHS-Sultonが挙げられる。

CD40に対する抗体としては、例えば受託番号がFERM BP-7578であるハイブリドーマKM302-1により産生されるものが挙げられる。

【0015】

(2) 以下の(g)～(j)から選ばれる少なくとも1つの性質を有する、CD40に対する抗体又はその機能的断片。

(g) CD40に対するリガンドの作用を中和する

(h) B細胞又はその樹立細胞株上のCD40に対するリガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を5D12より強く緩和又は中和し、かつ、抗免疫グロブリン抗体による架橋によって前記B細胞又はその樹立細胞株上のCD40に対するアゴニスティックな作用が5D12より弱い

(i) B細胞樹立株に対する、架橋したCD40LのCD95発現を増強する作用を5D12よ

り強く緩和あるいは中和する

(j) 樹状細胞に発現するCD40に対してアンタゴニスティックな作用を有する
上記抗体としては、受託番号がFERM BP-7579であるハイブリドーマKM281-1-10
、又は受託番号がFERM BP-7580であるハイブリドーマKM281-2-10-1-2により産生
されるものが挙げられる。

【0016】

- (3) 上記抗体又はその機能的断片を有効成分として含む医薬組成物。
- (4) (1)に記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む、免疫賦活化剤
(抗ウイルス剤、抗感染症剤)、抗腫瘍剤又は自己免疫疾患治療剤。
- (5) (2)に記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む、免疫抑制剤 (
脾臓移植や腎臓などの臓器移植時の拒絶反応の治療又は予防薬)、自己免疫疾患
治療剤 (リウマチ、動脈硬化治療薬、多発性硬化症、全身性エリトマトーデス又
は特発性血小板減少症など)、喘息などのアレルギー治療剤又は血液凝固第VIII
因子阻害症候群治療剤。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】

【発明の実施の形態】

発明者らは、後述するように、B細胞上のCD40に対してアンタゴニスティック
である公知のモノクローナル抗体5D12 (ATCC No.HB-11339) が、DC細胞上のCD40
に対してはアンタゴニスティックではなかったという知見を得た。さらに発明者
は、CD40Lの作用をブロックするアンタゴニスティック抗体であっても、多くの
モノクローナル抗体が抗免疫グロブリン抗体による架橋によって、それ自身がア
ゴニスティック活性を示してしまうことを見出した。

【0018】

1. 定義

本明細書で使用する用語の定義は以下のとおりである。

本発明でいう「ヒトCD40」とは、クラークら (E. A. Clark et. al., Proc. N
atl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986) 又はスタメンコビックら (I. Stamenkov
ic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989)により示されているアミノ酸配列を有する

ポリペプチドを意味し、特にB細胞、DC、マクロファージ、内皮細胞、上皮細胞、あるいはそれらの腫瘍細胞表面に発現する抗原ポリペプチドである。

「抗CD40抗体」とは、細胞発現CD40、全長CD40又は部分長CD40に対するモノクローナル抗体のいずれをも意味する。

【0019】

さらに、本発明で「抗体」とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域をコードする遺伝子（「抗体遺伝子」と総称する）に由来するものである。本発明の抗体には、いずれのイムノグロブリンクラス及びアイソタイプを有する抗体をも包含する。本発明における抗体の「機能的断片」とは、前記で定義した抗体の一部分（部分断片）であって、抗体の抗原への作用を1つ以上保持するものを意味し、具体的にはF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、ジスルフィド結合FV、一本鎖FV(scFV)、およびこれらの重合体等が挙げられる（D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T.J.International Ltd）。

【0020】

本発明で「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。

「アゴニスティック」とは、B細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現するCD40に、そのリガンドが結合することを促進する作用、あるいは、CD40リガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を、CD40を発現する細胞に与える作用を意味し、「アゴニスティック抗体」とは、そのようなアゴニスティック作用を有する抗体を意味する。

【0021】

「アンタゴニスティック」とは、B細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現するCD40にそのリガンドが結合することを阻害する作用、あるいは、CD40リガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を中和する作用を意味し、「アンタゴニスティック抗体」とはそのような作用を有する抗体を意味する。

【0022】

本発明で言う「樹状細胞（DC）」とは、樹状白血球とも呼ばれ、強力な抗原提

示機能を有する細胞の一群を指す。用いる樹状細胞は、例えば骨髓、さい帯血又は末梢血中に含まれるCD34陽性前駆細胞を培養することによって誘導される。あるいは、末梢血中のCD14陽性単球をGM-CSF及びIL-4の存在下で培養することにより得られる。

【0023】

「未熟なDC」(Immature DC)とは、CD14陰性、CD1a強陽性、CD83、CD86陽性、MHCクラスII陽性であるDCを意味する。

「成熟DC」とは、CD14陰性、CD1a陽性でCD83、CD86、MHCクラスII強陽性となったものを意味する。

【0024】

本発明で「DCを活性化する」とは、CD40による刺激に応答してDCが起こす変化を意味し、例えば未成熟DCを成熟化させ、CD80、CD86、HLA-ClassIIを高発現させる、さらにはIL-12の産生を増強する、あるいはT細胞が共存する場合には、T細胞に刺激を与え、増殖を促すことを意味する。

本発明でB細胞、B細胞株を活性化するとは、CD40による刺激に応答して細胞が起こす変化を意味し、例えばDNA合成を生じ、チミジン取り込みを促進し、CD95の発現量を増加させる。

【0025】

2. 抗体の取得

本件発明の抗体を取得するためには、抗原として組換え体で生産・精製した可溶性ヒトCD40、又はヒトCD40を発現する遺伝子組換えマウス細胞株をマウスに免疫することが好適である。免疫に使用するマウスはヒト抗体を産生するマウス(Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol197:722)であることが望ましい。組換え体で生産・精製した可溶性ヒトCD40に結合するモノクローナル抗体を選別することで、B細胞特異的に反応するクローンを選抜するよりも、B細胞以外の細胞に発現するCD40にも反応する抗体を得やすいと考えられる。免疫したマウスのリンパ節の細胞や脾細胞を使用し、モノクローナル抗体の製造において慣用されているケーラー及びミルシュタインらの方法(Nature., 1975 Vol.25 6:495)を用いてハイブリドーマの作製を行うことができる。

【0026】

また、BIAcore 2000（ビアコア社）などの表面プラズモン共鳴測定装置を用いて可溶性CD40LのCD40への結合を解析し、CD40Lと競合しない抗体を選別する。またBリンパ腫の細胞増殖抑制を抗体単独で抑制する抗体を選別した。さらに抗体の選別をDCに作用するか否かを指標として行うことにより、CD40Lと競合せず、樹状細胞又はB細胞に働き、かつCD40発現癌細胞の増殖を抑制するという利点を備えた抗体を作製・選別する。

【0027】

本発明の抗体は、取得されたハイブリドーマを培養することによることによって得られる。また、B細胞やハイブリドーマ等の抗体産生細胞からヒトモノクローナル抗体又はその可変領域をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えば哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することができる（P.J.Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P.Shepherd and C.Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J.W.Goding., Monoclonal Antibodies:principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS）。さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、そのトランスジェニック動物のミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特長、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地又は既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

【0028】

3. スクリーニング

アゴニスティック抗体の選抜には、ヒトBリンフォーマを用いた解析によって行い、CD95発現を促進する抗体の選別が可能である。さらに純化したDCの培養液

に抗体を添加し、成熟させる抗体を選ぶ。あるいは、未熟なDC細胞を用いた混合リンパ球反応でT細胞増殖活性を示す抗体を選ぶ。さらに成熟したDCに添加しIL-12生産促進作用のある抗体を選ぶ。また、CD40を発現する腫瘍細胞の増殖を抑制もしくは細胞死誘導活性を持つ抗体を選ぶ。CD40Lとの競合はBIACoreのような表面プラズモン共鳴測定装置を用いて、可溶性CD40と可溶性CD40リガンドの結合を抗体が阻害するかどうかで判別できる。あるいは、B細胞株に対するCD40リガンドの作用を増強するかどうかで判別する。

【0029】

アンタゴニスティック抗体の選抜には、ヒトBリンフォーマを用いた解析によって行い、さらにFLAGをタグとして有する可溶性CD40Lを抗FLAG抗体存在下で添加することで、可溶性CD40Lの、ヒトBリンフォーマ細胞上のCD40への結合をより強力に阻害する抗体の選別が可能である。次いでヒト抗体を抗ヒトIgG抗体で架橋することで、架橋によってBリンパ腫を活性化してしまうクローンを除外する。さらに純化し成熟させたDC細胞を用いた混合リンパ球反応でT細胞増殖抑制活性を示す抗体を選ぶ。

【0030】

以上のようにして得られた抗体は、以下の性質を有するものである。

(1) アゴニスティック抗体の場合

(a) 樹状細胞に作用し、LPS（リポポリサッカライド）及びIFN γ の存在化でIL-12を生産させる。この場合のLPS濃度は10pg/mlから10ng/mlであり、IFN γ の濃度は 10^{-4} Mから 10^{-2} Mである。

(b) 樹状細胞に結合し、樹状細胞を成熟させる作用を有する。しかも、 $20\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度、好ましくは $5\sim 15\mu\text{g/ml}$ の濃度で抗体を樹状細胞とともに培養すると、その成熟させる活性はG28-5抗体よりも高い結果が得られる。

(c) B細胞又はその樹立細胞株に対して、CD95の発現を促進する活性がG28-5抗体よりも高い。この場合、 $20\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度、好ましくは $5\sim 15\mu\text{g/ml}$ の濃度で上記細胞とともに培養すると高い活性を得ることができる。CD95の発現が促進するということは、抗体がB細胞を活性化したことの意味を有する。

ここで、B細胞樹立細胞株としては、Ramos細胞、HS-Sulton細胞が挙げられる

。なお、Ramos細胞はバーキットリンパ腫であり、ヒトの胚中心のB細胞のモデル細胞である。HS-Sulton細胞はバーキットリンパ腫である。

【 0 0 3 1 】

(d) B細胞樹立細胞株（Ramos細胞又はHS-Sulton細胞）に対してDNA合成、チミジン取り込み、増殖を抑制する活性がG28-5抗体よりも高い。この場合の抗体濃度は、少なくとも $0.05\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $0.1\sim 15\mu\text{g/ml}$ である。

(e) B細胞樹立細胞株に対して細胞死を誘導する。

(f) CD40リガンドのCD40に対する結合を阻害しない。「阻害しない」とは、CD40に予め抗体が結合した状態であっても、該抗体が存在しない場合と同程度に、CD40LがCD40に結合できることを意味する。

上記性質を有する抗体は、例えば、ハイブリドーマKM302-1（FERM BP-7578）により産生される。

【 0 0 3 2 】

(2) アンタゴニスティック抗体の場合

(g) CD40に対するリガンドの作用を中和する。ここで、「リガンドの作用」とは、樹状細胞又は他の細胞上に発現するリガンドの作用、及びCD40に対する遊離のリガンドの作用のいずれをも意味する。

【 0 0 3 3 】

(h) B細胞又はその樹立細胞株上のCD40に対するリガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を中和し、かつ、抗免疫グロブリン抗体による架橋によって前記B細胞又はその樹立細胞株上のCD40に対するアゴニスティックな作用を示さない。「CD40発現細胞に与える影響」とは、発現細胞の活性化を意味し、B細胞においてはチミジン取り込み、増殖を、B細胞樹立細胞株においてはCD95の発現増強などを意味する。また、DCにおいては成熟化、CD86、HLA-DR発現増強、共存するT細胞のチミジン取り込み、増殖の促進などを意味する。抗免疫グロブリン抗体による架橋は、培養液中に $0.1\mu\text{g/ml}$ 以上の抗免疫グロブリン抗体を存在させることにより行われる。

【 0 0 3 4 】

(i) B細胞樹立細胞株にCD40LがCD95の発現を増加させる活性を緩和又は中和す

る。タグに対する抗体などで架橋し、作用が増強されたCD40Lに対しても、活性を緩和あるいは中和する。CD40に対するリガンド（遊離のリガンド、特定の細胞に発現するリガンドの両者を含む）が、CD40発現細胞に結合すると、細胞内でシグナル伝達を起こして、最終的に細胞表面上にCD95（Fas）を発現する。従って、本発明のアンタゴニスティック抗体は、CD40に結合することにより、上記シグナル伝達を阻害してCD95の発現を中和する。この場合の抗体濃度は、 $1\mu\text{g/ml}$ である。

【0035】

(j) DC上のCD40に対してアンタゴニスティックである。すなわち、CD40LがDCを活性化する活性を緩和又は中和する。DCが共存するT細胞上のリガンドによって刺激されると、T細胞を活性化し、チミジン取り込みなどを促進させる。異なった個体由来のDCとT細胞とを共存させる混合リンパ球反応では、DCとT細胞が相互作用を起こすことで、T細胞の活性化が起こる。本発明のアンタゴニスティック抗体は、CD40に結合することにより、上記相互作用を阻害し、結果としてチミジンの取り込みが抑制される。この場合の抗体濃度は、少なくとも $0.001\mu\text{g/ml}$ であり、好ましくは $0.1\sim 10\mu\text{g/ml}$ である。

上記アンタゴニスティック抗体は、例えば、ハイブリドーマKM281-1-10（FERM BP-7579）、KM281-2-10-1-2（FERM BP-7580）により産生される。

【0036】

(3) 本発明の抗体は、当業者に周知である遺伝子工学的改変により異なるサブクラスのものに変換しうる。例えば、本件発明の抗体のサブクラスをIgG2あるいはIgG4に変換することにより、Fcレセプターに対する結合度を低下させることが可能である。さらに、定常領域のアミノ酸配列を人為的に改変すること、あるいはそのような配列を有する定常領域配列と本発明の抗体の可変領域とを結合することにより、Fcレセプターに対する結合度を低下させることも可能である。

また、本件発明の抗体に、放射性核種、細菌毒素、化学療法剤、プロドラッグなどを結合させることにより癌などの疾患の治療効果をさらに増強することも可能である。

【0037】

4. 医薬組成物

また、本発明の抗体の精製された製剤を含有する医薬組成物もまた、本発明の範囲内に含まれる。このような医薬組成物は、好ましくは、抗体に加えて、生理学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、他の抗体または抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することに再構成して使用してもよい。投与経路は、経口ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内の注射または配薬を含む非経腸的ルートである。

この場合、本発明の抗体の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得るキャリアとの組合せとして投与される有効量は、1回につき体重1kgあたり0.1mg～100mgであり、2日から8週間間隔で投与される。

【0038】

本発明の抗体を含む医薬組成物を使用する場合は、アゴニスティック抗体については、免疫賦活化剤（抗ウイルス剤、抗感染症剤）、抗腫瘍剤、自己免疫疾患治療剤であり、これらの疾患が複数併発してもよい。また、アンタゴニスティック抗体については、臓器移植時における免疫抑制剤（脾臓移植や腎臓などの移植時における拒絶反応、GVHDの予防又は治療剤）として、あるいは自己免疫疾患（例えば、リウマチ、動脈硬化治療薬、多発性硬化症、全身性エリトマトーデス、特発性血小板減少症、クローン病など）、喘息などアレルギー治療剤、血液凝固第VIII因子阻害症候群治療剤の治療薬として有用であり、これらの疾患が複数併発してもよい。

CD40が関与する疾患の治療手段として、抗CD40抗体を用いる場合、DC細胞の機能を指標に、抗体を選択することにより、より良い治療効果をもたらす抗体が得られると期待できる。

【0039】

アゴニスティック抗体では、よりDCの活性化ができる抗体を選抜することによ

り、免疫増強の作用の強い抗体が得られることが期待される。さらに成熟DCのIL-12の生産促進を指標とすることで、CTL誘導作用の強い抗体が得られる。CTL誘導により、ウィルス感染細胞や腫瘍細胞を除去する効果の高い抗体が得られる。また、相乗効果が期待できることからCD40に結合する抗体でありながら、CD40リガンドのCD40に対する結合は阻害しないような抗体が望ましい。癌治療を考えた場合、CD40を発現する癌細胞に直接細胞死を誘導あるいは増殖を抑制し、かつDC細胞を効率的に活性化する抗体があれば、相乗的な効果が期待され、CD40を発現しない腫瘍にも使用可能な治療薬となると考えられる。この抗体はウィルスの治療薬や抗腫瘍薬の治療薬として有用と考えられる。

【0 0 4 0】

一方、CD40に特異的に結合し、CD40Lの結合を抑制し、なおかつ、CD40を活性化しない抗体についても、B細胞に対するリガンドの作用を抑制するのみならず、DC細胞への作用を抑制できることが望まれる。しかし、今まで得られた、抗体はB細胞に対する効果を指標にとられてきたことから、樹状細胞にも強い抑制作用を持つ抗体を取得し、医薬品として開発することには大きな意義がある。さらに上述のように抗CD40抗体は架橋によって、全く逆の作用が懸念されるため、架橋によってもCD40を活性化しない抗体が必要とされる。これまでに報告されたヒトCD40に対する、マウス等の非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体、およびマウスモノクローナル抗体の可変領域とヒト免疫グロブリンの定常領域からなるキメラ抗体やCDRグラフティングによるヒト型化抗体は、抗原性を持つことが懸念されるため、CD40リガンドとの結合を阻害する抗体としてはヒト抗体が望ましい。

【0 0 4 1】

【実施例】

〔実施例1〕 抗原の作製

(1)細胞

EL-4細胞は、マウス由来のT細胞樹立株であり、容易に入手することができる(ATCC No.:TIB-39)。Ramos B細胞(ATCC No.:CRL-1596)並びにマウス抗CD40抗体産生ハイブリドーマ G28-5(HB-9110)及び5D12(HB-11339)は、ATCCから購入

した。

【 0 0 4 2 】

(2) 抗原の発現と精製

ヒトCD40cDNAを鋳型として、以下のプライマーを用いて、PCRにより（95℃ 5秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒）×20サイクルの条件で細胞外領域を増幅した。

【 0 0 4 3 】

プライマー 1： 5'-CCCAGATCTGTCCATCCAGAACCACCCACTGCATGCAGAG-3'（配列番号1）

プライマー 2： 5'-ACAAGATCTGGGCTCTACGTATCTCAGCCGATCCTGGGGAC-3'（配列番号2）

増幅したcDNAは、pFastBacベクター（Gibco BRL）の、メリチンシグナル配列の後、ヒトIgG1由来FC又はマウスIgG2b由来FC領域の前に挿入した。CD40生産のため、組替えバキュロウィルスは、使用説明書にしたがって作成した。Tn5細胞を組替えウィルスで感染させた後、4日間培養した。上清は、0.22μmフィルターで処理した後、ProteinG sepharose（Amersham Pharmacia）を添加し、4℃で静かに振倒した。一晩後、sepharoseをカラムに移し、20倍容量のPBSで洗浄した。ヒトCD40 FC蛋白質は、20mMグリシン緩衝液（pH3.0）により溶出した。CD40を細胞表面に発現させるためのベクターは、Randolph J. Noelleから入手した（Inui, S et al., EJI, 20, 1747-1753, 1990）。全長cDNAはXbaIにより酵素切断し、pCDNA3（INVITROGEN）に挿入した。ベクターをEL-4細胞に導入し、0.5mg/mlのG418（Gibco BRL）存在下で培養することにより安定発現株を得た。CD40の発現は、FITC-結合抗ヒトCD40抗体（Pharmingen）を使い、FACS解析により確認した。

【 0 0 4 4 】

〔実施例2〕 免疫用マウスの作製

免疫に用いたマウスは、内因性Ig重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体の遺伝的背景を有しており、かつ、ヒトIg重鎖遺伝子座を含む14番染色体断片（SC20）及びヒトIgκ鎖トランスジーン（KCo5）を同時に保持する。このマウスはヒトIg重鎖遺伝子座を持つ系統Aのマウスと、ヒトIgκ鎖トランスジーンを持

つ系統Bのマウスとの交配により作製した。系統Aは、内因性Ig重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な14番染色体断片 (SC20) を保持するマウス系統であり、例えば富塚らの報告 (Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol197:722) に記載されている。また、系統Bは内因性Ig重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、ヒトIg κ 鎖トランスジェン (KCo5) を保持するマウス系統 (トランスジェニックマウス) であり、例えば Fishwildらの報告 (Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845) に記載されている。

【 0 0 4 5 】

系統Aの雄マウスと系統Bの雌マウス、あるいは系統Aの雌マウスと系統Bの雄マウスの交配により得られる子マウスを富塚らの報告 (Tomizuka et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol197:722) に記載された方法で解析し、血清中にヒトIg重鎖及び κ 軽鎖が同時に検出される個体 (ヒト抗体産生マウス) を選抜し (Ishida&Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000)、以下の免疫実験に用いた。なお、前記ヒト抗体産生マウスは、契約を結ぶことによって、麒麟麦酒株式会社より入手可能である。

【 0 0 4 6 】

〔実施例3〕 ヒトCD40に対するヒトモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、単クローン抗体実験操作入門 (安東民衛ら著作、講談社発行 1991) に記載される一般的方法に従って調製した。免疫原としてのヒトCD40は、実施例1で調製したヒトCD40ヒトFcとCD40発現EL-4細胞を用いた。被免疫動物は、実施例2で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウスを用いた。

【 0 0 4 7 】

ヒト抗体産生マウスに、CD40:hFcを1個体当たり2から100 μ g/回で免疫した。抗原溶液は初回を除いて等量の不完全フロイントアジュバント (シグマ) と混合し、皮下に数カ所に分けて注入した。約10日から3週間ごとに3-4回免疫を行った。初回は不完全フロイントアジュバント (シグマ) を用いた。マウスの尾から採血し、血清中のCD40に対するヒト抗体 γ および κ を、ELISAを用いて測定した。脾臓を摘出する3-4日前に尾静脈より、PBSに溶解したCD40:Fcを20 μ g注射し最終

免疫した。

【0 0 4 8】

ヒト抗体産生マウスに、ヒトCD40発現するマウスEL-4細胞を免疫した。EL-4細胞 10^8 個/mlでPBSに懸濁し、予めPBSでエマルジョン化した等量のRIBIアジュバントと緩やかに混合した。細胞は約10日から3週間ごとに3-5回免疫を行った。アジュバントを用いない場合は、8000radでX線照射し用いた。

【0 0 4 9】

免疫されたマウスから脾臓を外科的に取得し、回収した脾臓細胞をマウスミエローマSP2/0 (ATCC No.: CRL1581) と 5 : 1 で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール1500 (Boehringer Mannheim社製) を用いて細胞融合させることにより多数のハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum、FCS) とヒポキサンチン(H)、アミノプテリン(A)、チミジン(T)を含有するHAT含有DMEM培地 (Gibco BRL社製) 中で培養することにより行った。さらに、HT含有DMEM培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、96-wellマイクロタイタープレート (ベクトンディッキンソン社製) 中で行った。抗ヒトCD40ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択 (スクリーニング) は、実施例4で後述する酵素標識免疫吸着アッセイ (ELISA) および蛍光活性化セルソーター (FACS) により測定することにより行った。

【0 0 5 0】

ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのELISAによるスクリーニングは、以下に述べる3種類のELISAおよびFACS解析により、ヒト免疫グロブリン γ 鎖 (hIg γ) 及びヒト免疫グロブリン軽鎖 κ を有し、かつヒトCD40に特異的な反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生する多数のハイブリドーマを得た。なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに実施例における試験結果として示した表または図中においては、各々の本発明のヒト抗ヒトCD40モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンは記号を用いて命名した。また、当該記号の次に「抗体」を付したものは、それぞれのハイブリドーマにより産生される抗体を意味する。以下のハイブリドーマクローンはシングルクローンを表わす

【0051】

アゴニスティック抗体:

KM302-1、KM341-1-19、KM643-4-11

アンタゴニスティック抗体:

KM 281-1-10、KM281-2-10-1-2、KM283-5、KM292-1-24、KM225-2-56、KM341-6-9

それらの内3つのハイブリドーマクローンKM 302-1、KM 281-1-10、KM 281-2-10-1-2を、平成13年5月9日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1）にブダペスト条約に基づき国際寄託した。

【0052】

名称	受託番号
KM302-1	FERM BP-7578
KM281-1-10	FERM BP-7579
KM281-2-10-1-2	FERM BP-7580

【0053】

〔実施例4〕 ハイブリドーマのスクリーニング

ヒト免疫グロブリン γ 鎖を有するモノクローナル抗体の検出

実施例1で作製したヒトCD40マウスFC ($1\mu\text{g/ml}$) $50\mu\text{l}$ /ウェルを、ELISA用96穴マイクロプレート (Maxisorp、Nunc社製) の各ウェルに加え、 4°C でインキュベートし、ヒトCD40マウスFCをマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (ブロックエース、大日本製薬) を加え室温でインキュベートしブロックした。各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 ($50\mu\text{l}$) を加え、反応させた後、各ウェルを、 0.1% Tween20含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で洗浄した。次いで、過酸化酵素で標識されたヤギ抗ヒトIgG (γ) 抗体 (シグマ、A0170) を 1% FBS含有PBS-Tで5,000倍に希釈した溶液 ($50\mu\text{l}$ /ウェル) を、各ウェルに加え、インキュベートした。マイクロプレートを、PBS-Tで3回洗浄後、発色基質液 (TMB、 $50\mu\text{l}$ /ウェル、住友ベークライト社製) を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。各ウェルに、停止液 ($50\mu\text{l}$ /

ウェル)を加え、反応を止めた。波長450nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その結果、160クローン以上の抗ヒトCD40抗体が取得できた。その一部を表1に示す。

【0054】

【表1】

アゴニスティック抗体

ハイブリドーマ	抗原	サブクラス	DC	腫瘍細胞
KM302-1	CD40マウスFC	IgG4	活性化	増殖抑制
KM341-1-19	ヒトCD40発現EL-4	IgG2	未実施	未実施
KM643-4-11	CD40マウスFC	未確定	未実施	未実施

【0055】

【表2】

アンタゴニスティック抗体

ハイブリドーマ	抗原	サブクラス	架橋の影響	DC-MLR
KM281-1-10	CD40マウスFC	IgG1	小	抑制
KM281-2-10-1-2	CD40マウスFC	IgG1	小	未実施
KM283-5	CD40マウスFC	IgG4	大	抑制せず
KM225-2-56	CD40マウスFC	IgG4	大	未実施
KM292-1-24	CD40マウスFC	IgG2	大	未実施
KM341-6-9	ヒトCD40発現EL-4	IgG1	大	未実施

【0056】

ヒト免疫グロブリン軽鎖 κ (Ig κ)を有するモノクローナル抗体の検出は、過酸化酵素で標識したヤギ抗ヒトIg κ 抗体(1,000倍希釈、50 μ l/ウェル、Southern Biotechnology社製)を用いた他は、上述したヒト免疫グロブリン γ 鎖のELISAと同様に行った。

【0057】

各モノクローナル抗体のサブクラス同定は、それぞれ過酸化酵素で標識したヒツジ抗ヒトIgG1抗体、ヒツジ抗ヒトIgG2抗体、ヒツジ抗ヒトIgG3抗体又はヒツジ抗ヒトIgG4抗体(各2,000倍希釈、50 μ l/ウェル、The Binding Site社製)を用

いた他は、上述したヒト免疫グロブリン γ 鎖のELISAと同様に行った。

ヒトCD40発現細胞に対する各モノクローナル抗体の反応試験

CD40が発現していると報告されているRamos細胞株に対する各モノクローナル抗体の反応性の検討をFACS解析で行った。

【0058】

2x10⁶/mlの濃度でRamos細胞株を0.1%NaN₃、2%FCS含有PBSの染色バッファー (S B) に浮遊させた。細胞浮遊液 (100 μ l/ウェル) を96-well 丸底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。各々のハイブリドーマの培養上清 (50 μ l) を加え、氷温下30分間インキュベートした。陰性コントロールとしてヒト血清アルブミンに対するヒトIgG1抗体を用い、ハイブリドーマ培養培地で2 μ g/mlの濃度に調製し、50 μ l添加後氷温下15分間インキュベートした。SBで洗浄した後、250倍希釈したR-PE蛍光標識抗ヒト抗体 (Southern Biotechnology社製) 50 μ l を加え、氷温下15分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、300-500 μ lのFACS緩衝液に懸濁し、FACS (FACSort、FACScan、ベクトンディッキンソン社製) で各細胞の蛍光強度を測定した。その結果、Ramos細胞株に結合活性を有する抗体を選別した。

【0059】

〔実施例5〕 各抗体の調製

モノクローナル抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。

抗CD40抗体産生ハイブリドーマをウシインシュリン (5 μ g/ml、Gibco BRL社製)、ヒトトランスフェリン (5 μ g/ml、Gibco BRL社製)、エタノールアミン (0.01mM、シグマ社製)、亜セレン酸ナトリウム (2.5x10⁻⁵ nM、シグマ社製) 含有e RDF培地 (極東製薬社製) に馴化した。スピナーフラスコにて培養し、ハイブリドーマの生細胞率が90%になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、10 μ m と0.2 μ mのフィルター (ゲルマンサイエンス社製) に供し、ハイブリドーマ等の雑排物を除去した。

【0060】

上記培養上清からの抗CD40抗体の精製は以下の方法で行った。抗CD40抗体を含む培養上清をHyper D Protein A カラム (日本ガイシ製) を用い、付属の説明書

に従い吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3) を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpH7.2 付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜 (10000カット、Spectrum Laboratories社製) を用いてPBS(-)に置換し、孔径0.22 μ m のメンブランフィルターMILLEX-GV (MILLIPORE 製) でろ過滅菌した。精製抗体の濃度は280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.45 OD として算出した。

【0061】

〔実施例6〕 Ramos細胞における抗CD40アゴニスティック抗体によるCD95発現促進

5.0x10⁵個/mlのRamos細胞懸濁液を96ウェルプレートに100 μ l/wellで播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を20 μ g/mlに培地で希釈し、96ウェルプレートに100 μ l/wellの濃度で添加した。一晚培養後、細胞を集めR-PE標識抗CD95抗体 (Pharmingen NJ) を用い、FACSを使って解析した。図1に結果を示す。図中横軸はCD95の発現強度を示す。抗体添加を太線、未添加を細線により示した。KM302-1抗体は、既存G28-5抗体に比して、CD95発現をより促進することが示された。すなわち、より効果の高いアゴニスティックであることが示された。

【0062】

〔実施例7〕 Ramos細胞における抗CD40アンタゴニスティック抗体によるCD95発現抑制

1.0x10⁶個/mlのRamos細胞懸濁液を96ウェルプレートに50 μ l/wellで播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を2 μ g/mlに培地で調整し、96ウェルプレートに100 μ l/well添加した。可溶性CD40リガンドを4 μ g/mlと抗FLAG抗体 (M2、シグマ) 4 μ g/mlとを培地に添加し、96ウェルプレートに50 μ l/well添加した。一晚培養後、細胞を集めR-PE標識抗CD95抗体 (Pharmingen NJ) を用い、FACSを使って解析した。図2、図3に結果を示す。図中横軸はCD95の発現強度を示す。KM281-1-10、KM281-2-10-1-2、KM283-5、KM292-1-24、KM225-2-56の各ハイブリドーマが生産した抗体では陰性コントロールと同程度までCD95の発現を抑制した。図3においてKM281-1-10抗体は、既存5D12抗体がわずかにしかCD95発現を抑制しなかったのに比して、CD95発現をより抑制することが示された。すなわち、よ

り効果の高いアゴニスティックであることが示された。これによってヒトモノクローナル抗体がアンタゴニスティック抗体であることが示された。

【0063】

抗免疫グロブリン抗体による架橋の影響

1.0x10⁶個/mlのRamos細胞懸濁液を96ウェルプレートに50 μ l/wellで播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を2 μ g/mlに培地で調整し、96ウェルプレートに100 μ l/well添加した。抗ヒトIgG抗体（シグマ、I3382）あるいは抗マウスIgG抗体（Biosource、AMI3401）を4 μ g/mlとなるよう培地に添加し、96ウェルプレートに50 μ l/well添加した。一晚培養後、細胞を集めR-PE標識抗CD95抗体（Pharmingen NJ）を用い、FACSを使って解析した。図4、図5に結果を示す。図中横軸はCD95の発現強度を示す。KM281-1-10、KM281-2-10-1-2の各ハイブリドーマが生産した抗体ではCD95の発現を抑制した。しかし、5D12、KM283-5、KM292-1-24、KM225-2-56の各ハイブリドーマが生産した抗体ではCD95の発現を逆に増強した。

【0064】

〔実施例8〕 Ramos細胞における抗CD40アゴニスティック抗体による増殖抑制

1.0x10⁵個/mlのRamos細胞、HS-Sulton懸濁液を96ウェルプレートに100 μ l/wellで播種した。精製抗体あるいは可溶性CD40リガンドと抗FLAG抗体（M2）との等量混合物を培地に添加し、2日培養後、100 μ Ci/mlの³H-Thymidine（Amersham Pharmacia）を10 μ l添加した。18時間後、Macro96 Harvester（SKATRON）を用いて、Printed Filtermat A（Wallac）にハーベストし、乾燥後Betap;Scint（Wallac）に良く浸し、パッケージング後、1205 BETAPLATE液体シンチレーションカウンターで活性測定した。図6に結果を示す。図中、縦軸は細胞による³Hチミジンの取り込み量を、横軸は培養液中の抗体あるいはCD40L濃度を示す。Ramos細胞、HS-Sulton細胞ともに、KM302-1抗体を添加した場合に、従来のG28-5抗体やCD40Lと比較して、チミジンの取り込みが低く、KM302-1抗体が腫瘍細胞の増殖を効果的に抑えられるアゴニスティック抗体であることが示された。

【0065】

〔実施例9〕 CD40アゴニスティック抗体による樹状細胞の活性化

(1) 材料及び方法

組換え型ヒトIL-4はGenzyme techne社より購入した。抗ヒトCD14 MACS beadsはMiltenyi Biotech GmbH社より購入した。LymphoprepはNycomed Pharma ASより購入した。培養に用いた培地は、DC誘導時にはRPMI1640(Gibco BRL)に10% heat inactivated FCS(Cell Culture Technologies), 10mM HEPES(Sigma), 55 μ M 2-mercaptoethanol (Gibco BRL), 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓) を加えて用いた。染色時の細胞洗浄には2% FCS (Cell Culture Technologies), 0.02% Azad添加PBS (Sigma)を用いた。細胞凍結時には日本全薬工業社製のセルバンカーを用いた。

【0066】

(2) 単球由来DCの誘導

末梢血よりLymphoprepを用いた密度勾配遠心により単核球を調製した (PBMC)。これを抗ヒトCD14 MACS beadsでポジティブセクションすることによりCD14陽性画分と陰性画分に分離した。陽性画分に組換え型ヒトGM-CSF (50ng/ml)と組換え型ヒトIL-4 (100ng/ml)を添加して、10%FCSを添加したRPMI1640培地にて6wellプレートで培養した。培養開始時の細胞濃度は 1×10^6 /mlで1wellに3mlずつで行った。培養中は2日に1度の培地交換を行った。培地交換は培養液の1割を遠心チューブにとり遠心し、上清を除去後、とった培養液の2倍容量の新しい培養液(サイトカインなどを上記濃度で含む)で懸濁し、各wellに戻した。培養6日目には細胞を回収し、細胞数を計算後、上記培地に 1×10^6 /mlの濃度で懸濁し、抗CD40抗体又はそのアイソタイプ対照を添加して24wellプレートでさらに4日間の培養を行った。この間培地交換は行わなかった。

【0067】

(3) 細胞染色及びフローサイトメーターによる解析

染色には抗HLA-DR抗体(アイソタイプ対照: rat IgG2a)、抗CD86 抗体(アイソタイプ対照: ラットIgG1)、抗CD83抗体(アイソタイプ対照: ラットIgG2b)を用いた。まず、抗体を加え30分、4℃でインキュベートした後、3回の洗浄し、Beckton Dickinson社製FACS Caliburを用いて解析を行った。

【0068】

(4) Mature DCに対するIL-12 secretion能の亢進

上記のように未成熟 DCを得た後、LPS (400pg/ml)とIFNg(10^{-3} M)を加えさらに2日間の培養後成熟 DCを得た。これに抗CD40抗体またはアイソタイプ対照を 10μ g/ml加え、24時間後の上清についてIL-12の産生をELISA (Pharmingen社製)法にて測定した。

【0069】

(5) 結果および考察

アゴニスティック抗体であるKM302-1抗体が、DCの成熟化に及ぼす抗体の影響を図7に、成熟DCのIL-12生産に及ぼす影響を図8に示す。G28-5抗体を対照として成熟の度合いを比べた。CD86、HLA-DRの発現を見た結果、G28-5抗体と比較して、KM302-1抗体ではさらに発現が上昇し、すなわち成熟度が亢進させることが示された。また、IL-12の分泌については成熟DCへのKM302-1抗体の処理によって亢進することが示された。以上よりKM302-1抗体が、DCに対するアゴニスティック抗体として作用することが示された。

【0070】

〔実施例10〕 DC-MLR

正常ヒトから採取した血液（末梢血）を、2000rpm 10分遠心し、血清を吸い取った。血球分画をPBSで再懸濁し、Ficoll (Amersham Pharmacia) の上に静かに載せた。2000rpm 30分遠心し、中間層のPBMC部分を回収する。PBSで2回洗浄した後、MACSを用い特定の細胞分離に使用した。

【0071】

DC培養のための単球の分離は、MACS (Miltenyi Biotec GmbH) を用い添付の説明書にしたがって行った。簡単に説明すると、PBMC 1×10^8 個に対して、MACS Buffer 800μ l, MACS CD14 (Miltenyi Biotec GmbH, 502-01) 200ulを添加し、4℃で15分処理した。MACS LS カラムに細胞を吸着させ、洗浄した。カラムに吸着した細胞を単球として回収した。カラムに吸着しなかった細胞に、MACS HLA-DR (Miltenyi Biotec GmbH, 461-01) を添加し、BSカラムでHLA-DR陽性細胞を除去し、T細胞画分とした。FACSによりCD3陽性細胞の比率を計測し、T細胞画分全体の細胞数より実質的なT細胞数を算出した。得られた単球は、6 ウェル培養皿

に、 1×10^6 細胞/mlの濃度で100ng/mlのIL-4 (R&D system), 50ng/ml のG-CSF (KIRIN), 10%のFCS (SIGMA)を含むR0培地 (PPMI培地に、 β -メルカプトエタノール (Gibco), HEPES (SIGMA) を添加したもの) で培養した。培養5日後に、10ng/mlのLPS (DIFCO) を添加し、成熟DCに分化させた。

【0072】

MLRは、異なるヒトから分離した、T細胞と成熟DCを混合することにより行った。T細胞/DCの細胞比をそれぞれ、1:80とし、T細胞数は、 2×10^5 細胞/ウェルとする。まず最初に、DCに抗体を加え30分間反応させる。その後、T細胞を加え、4日培養した後に、 $100 \mu\text{Ci/ml}$ の ^3H -Thymidine (Amersham Pharmacia)を $10 \mu\text{l}$ 添加した。14時間後、Macro96 Harvester(SKATRON)を用いて、Printed Filtermat A (Wallac)にハーベストし、乾燥後Betap;Scint (Wallac)に良く浸し、パッケージング後、1205 BETAPLATE液体シンチレーションカウンターで活性測定した。また未成熟DCを用いたMLRは、異なるヒトから分離した、T細胞と成熟DCを混合することにより行った。T細胞/DCの細胞比をそれぞれ、1:40として同様に行った。図9、図10に結果を示す。KM281-1-10抗体の添加によりチミジンの取り込みが低く、MLRが抑えられることが示された。また、図10においてKM283-5、5D12抗体はDC-MLRを抑制できず、すなわちKM281-1-10抗体のみがDCに対するCD40リガンドの働きを中和するアンタゴニスティック抗体であることが示された。図11にアゴニスティック抗体であるKM302-1抗体が、未成熟DCを用いたMLRに及ぼす抗体の影響を調べた結果を示す。DCが活性化することにより、T細胞との相互作用が促進され、チミジンの取り込みが増加している。これによりKM302-1は未成熟DCに作用するアゴニスティック抗体であることが示された。

【0073】

〔実施例11〕 CD40抗体によるCD40LのCD40への結合に及ぼす影響

BIAcore 2000 (ピアコア) を用いて、抗CD40抗体を、固定化されたCD40ヒトFCに結合させた後、可溶性CD40LのCD40への結合量の変化を測定した。装置に付属した説明書に従い、可溶性CD40ヒトFCをCMチップ (CM5, ピアコア) に固定化した。次いで $25 (\mu\text{g/ml})$ の抗CD40抗体を添加し、CD40に結合させた。さらに $10 (\mu\text{g/ml})$ 可溶性CD40Lを添加し結合させた。CD40L添加前後の結合量の差を測定した

。コントロールIgGを添加した場合、CD40Lの結合量は100RUとなった。KM302-1抗体添加後では、CD40Lの結合量は110RUとなり、KM283-5抗体添加後では、18RUとなった。これにより、KM302-1抗体はCD40LのCD40への結合を阻害しないことが示された。

【 0 0 7 4 】**【発明の効果】**

本発明により、CD40に対する抗体が提供される。本発明の抗体は、CD40に対してアゴニスティックに作用するもの及びアンタゴニスティックに作用するものの両者が含まれるため、それぞれ、免疫賦活剤、免疫抑制剤等として有用である。

【 0 0 7 5 】**【配列表】**

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Anti CD40 monoclonal antibody

<130> P01-0364

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

cccagatctg tccatccaga accacccact gcatgcagag 40

<210> 2

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

acaagatctg ggctctacgt atctcagccg atcctgggga c 41

【 0 0 7 6 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1：合成DNA

配列番号 2：合成DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】

KM302-1抗体が、CD95発現を促進する結果を示す図である。

【図 2】

アンタゴニスティック抗体がRamos細胞に対するCD40リガンドの働きを中和することを示す図である。

【図 3】

KM281-1-10抗体がRamos細胞に対するCD40リガンドの働きを中和することを示す図である。

【図 4】

架橋されたKM281-1-10抗体がCD95発現を促進しない結果を示す図である。

【図 5】

架橋された5D12抗体が、CD95発現を促進する結果を示す図である。

【図 6】

KM302-1抗体による腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を示す図である。

【図 7】

KM302-1抗体が、DC細胞の成熟化を促進する結果を示す図である。

【図 8】

KM302-1抗体が、DC細胞にIL-12生産を促進する結果を示す図である。

【図 9】

KM281-1-10抗体による、DCに対するCD40リガンドの働きを中和することを示す図である。

【図 1 0】

KM281-1-10抗体による、DCに対するCD40リガンドの働きを中和することを示す図である。

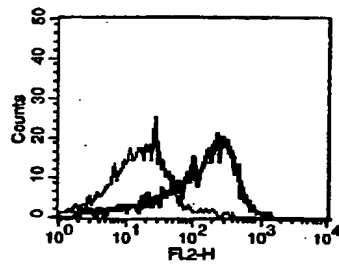
【図 1 1】

KM302-1抗体による未成熟DC-MLRを活性化することを示す図である。

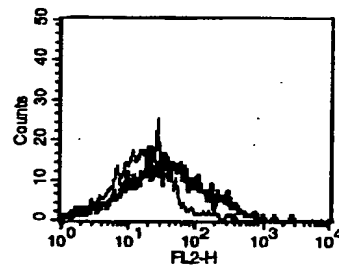
【書類名】

図面

【図 1】

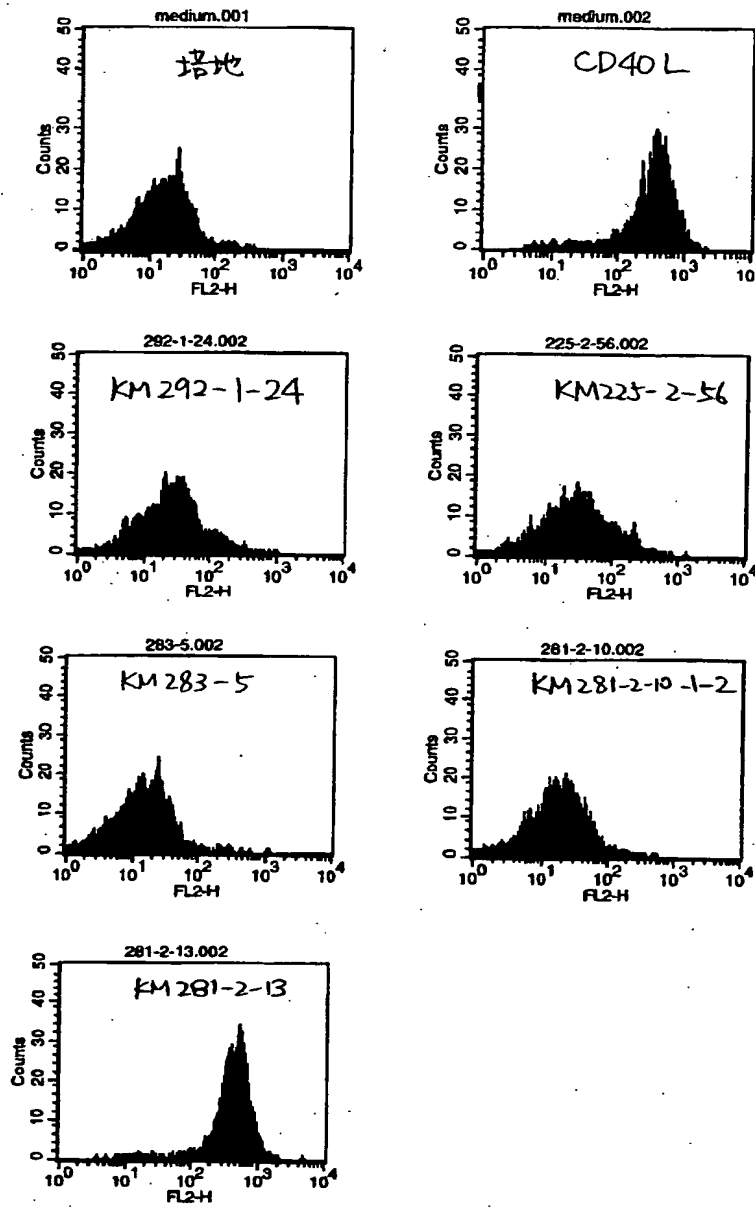


KM302-1抗体

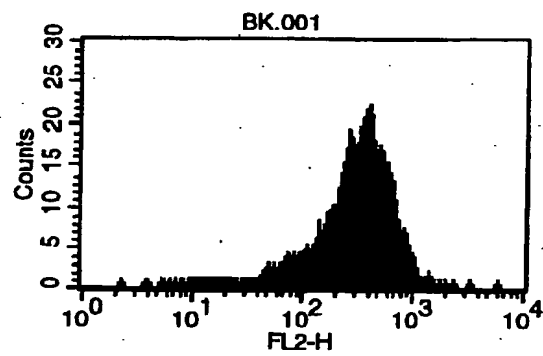


G28-5抗体

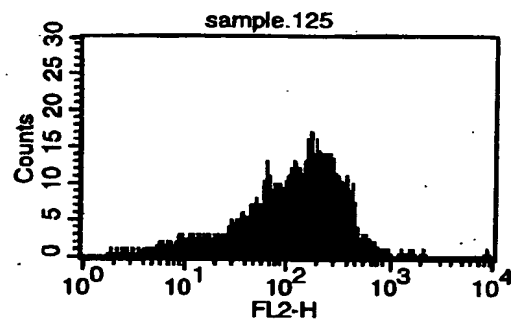
【図 2】



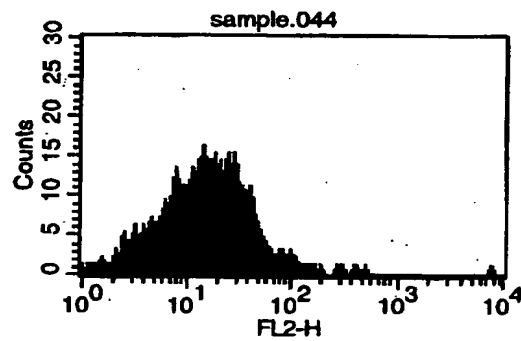
【図 3】



CD40Lのみ

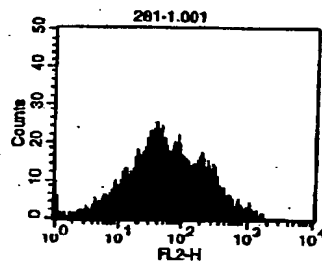


CD40L+5D12

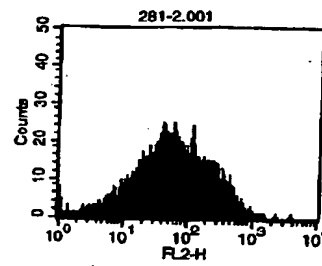


CD40L+KM281-1-10

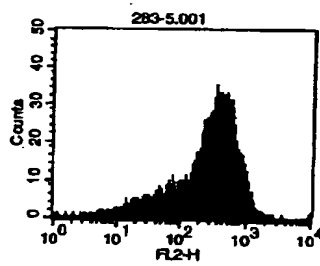
【図 4】



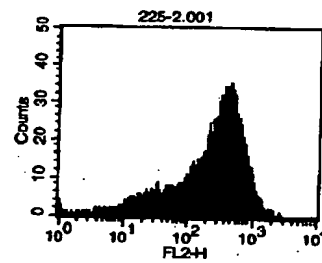
KM281-1-10



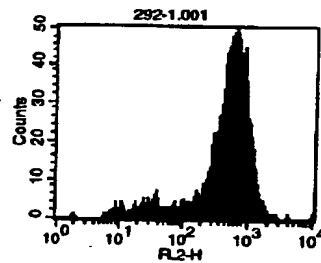
KM281-2-10-1-2



KM283-5

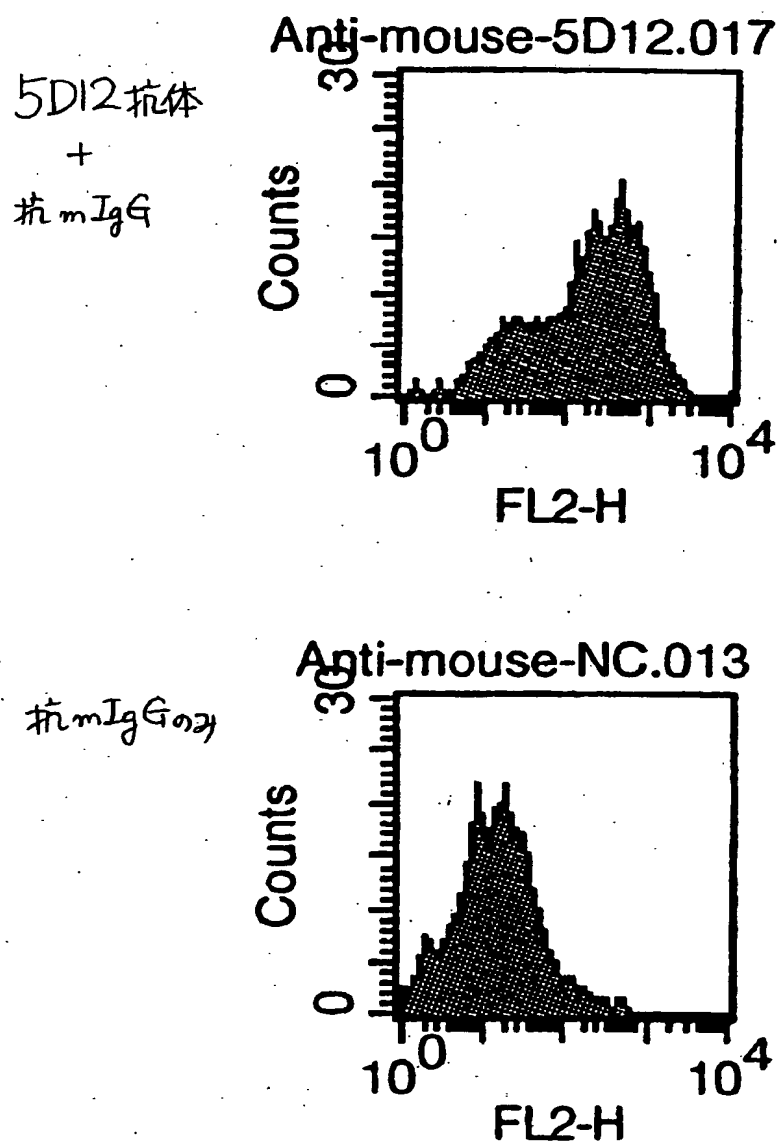


KM225-2-56

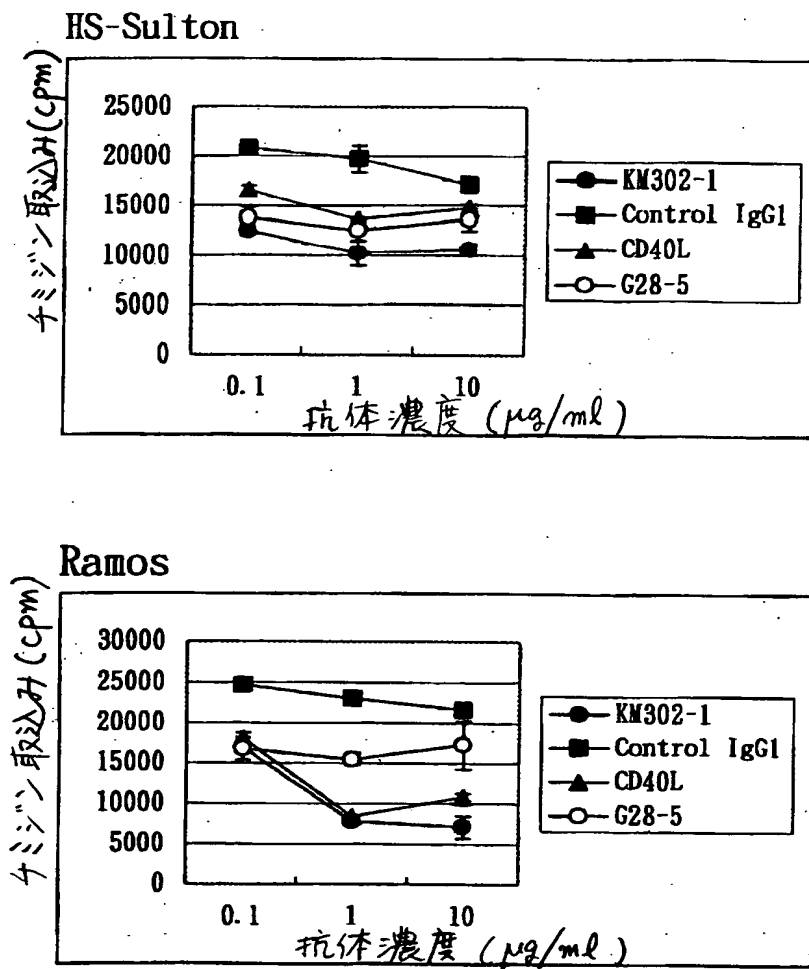


KM292-1-24

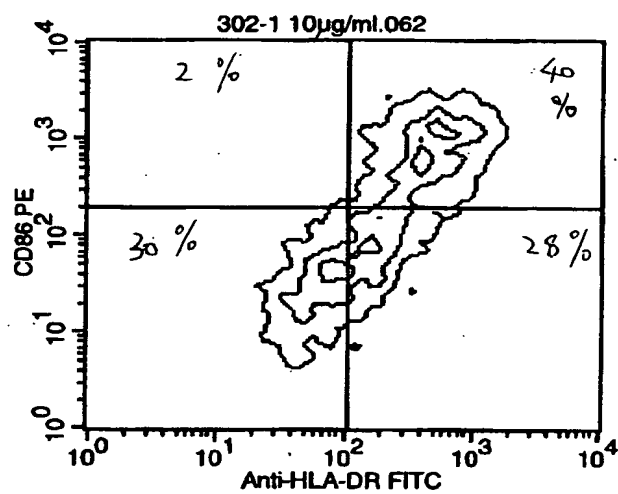
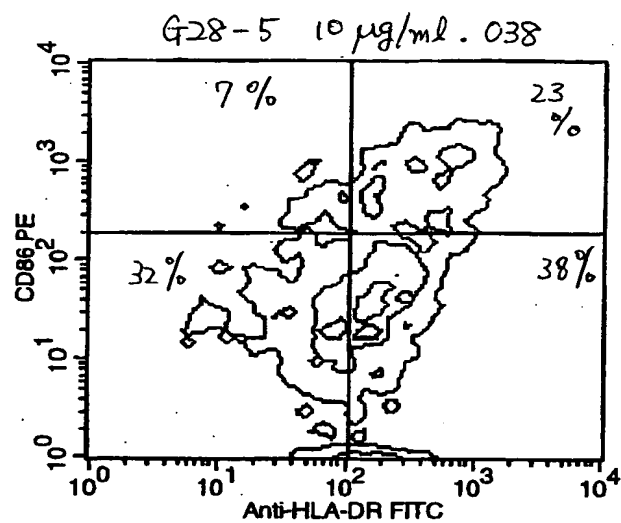
【図5】



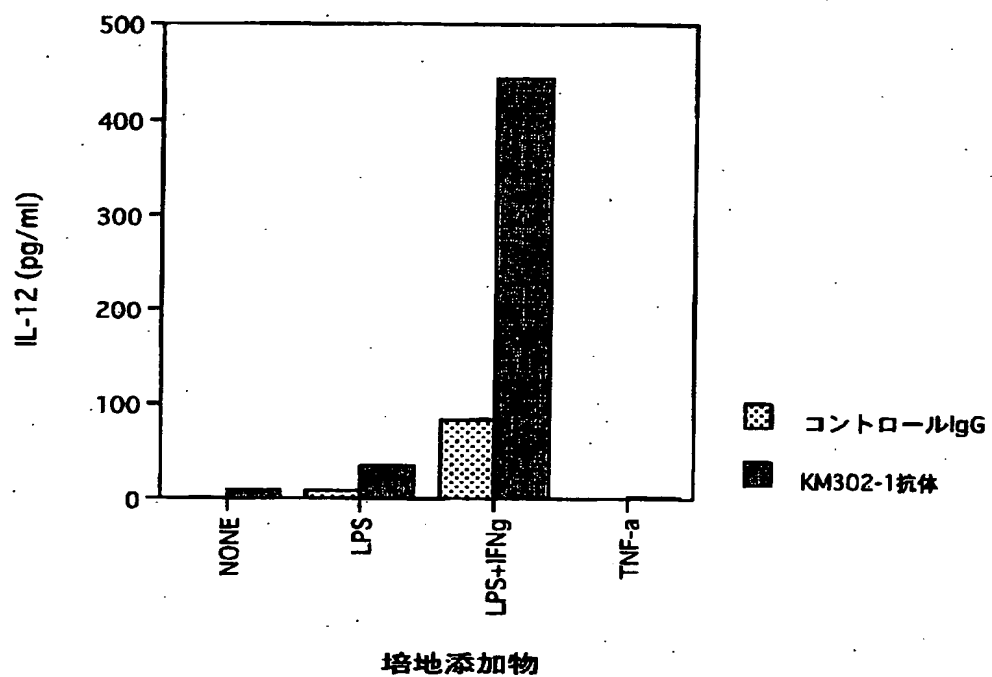
【図 6】



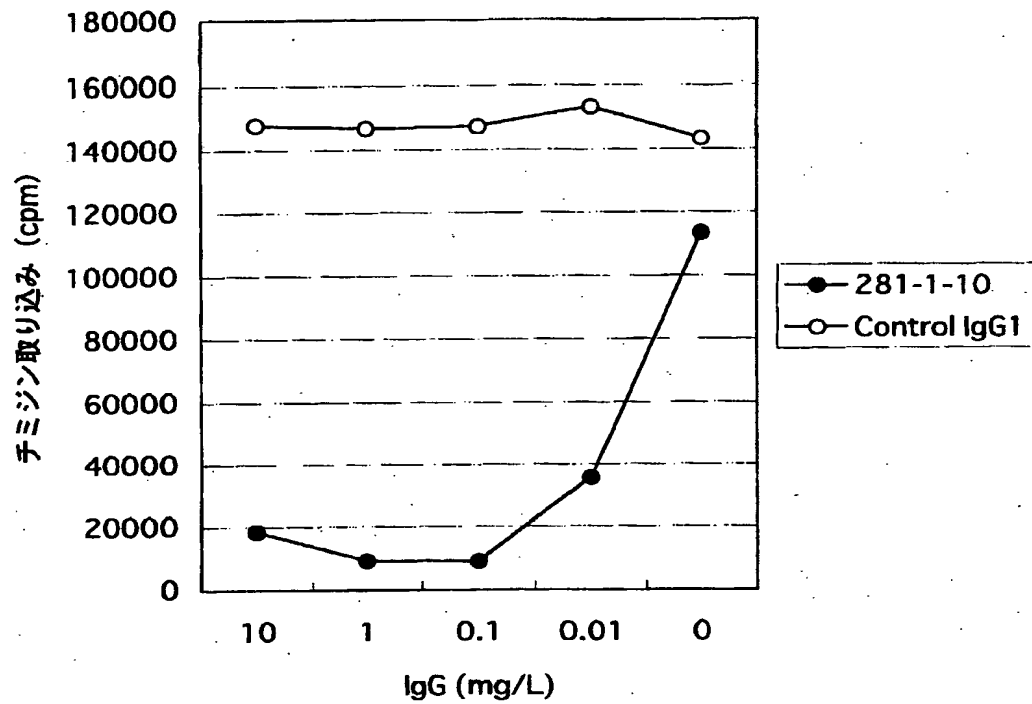
【図7】



【図8】

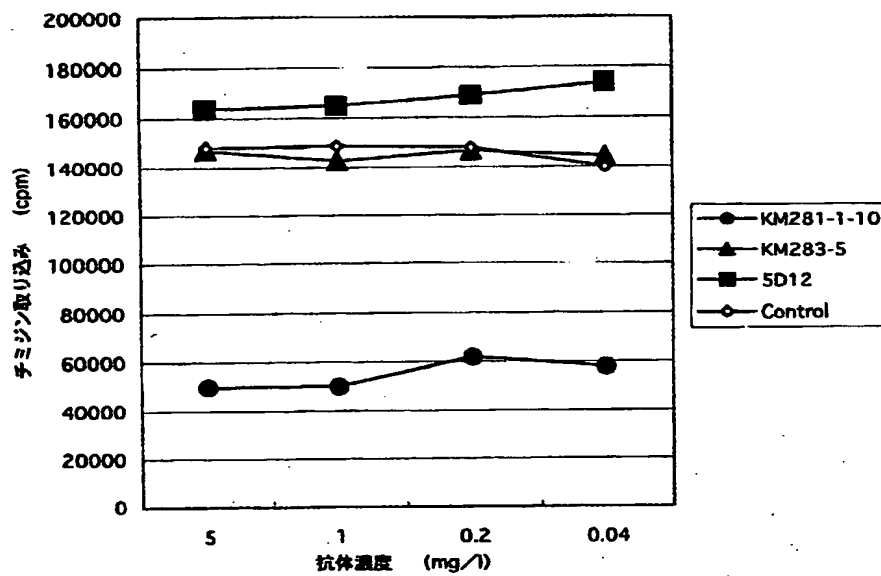


【図 9】

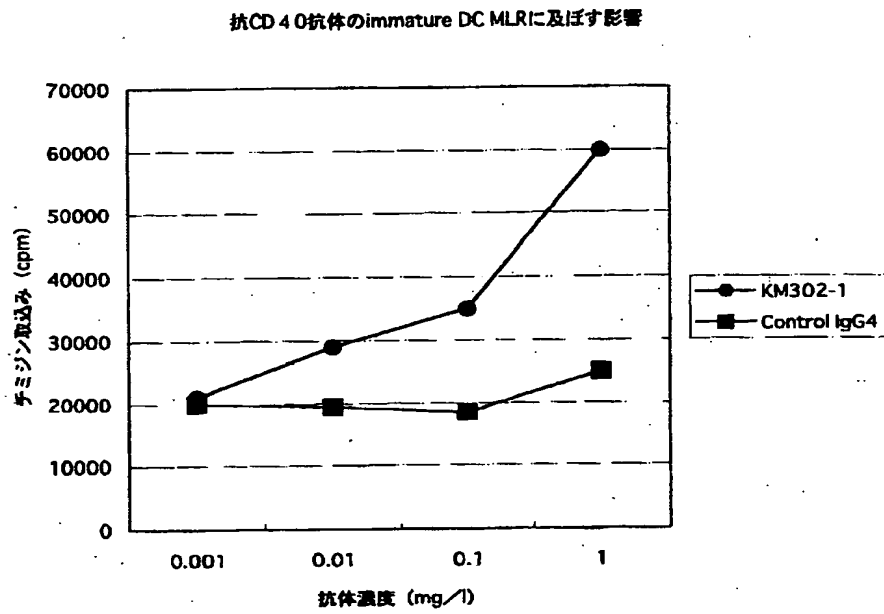


【図 10】

抗CD40抗体によるDC-MLR抑制



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 CD40に対する抗体の提供。

【解決手段】 CD40に対し、アゴニスティックに又はアンタゴニスティックに作用する抗体又はその機能的断片。

【選択図】 なし

特願 2001-142482

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000253503]

1. 変更年月日

1995年 6月14日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区新川二丁目10番1号

氏 名

麒麟麦酒株式会社